ChinaXiv合作期刊

里氏木霉几丁质酶表达及其水解产物组成与结构分析*

焦思明，程 功，张毓宸，冯翠，任立世，李建军，杜昱光**[1]
(中国科学院过程工程研究所 生化工程国家重点实验室，北京 100190)

摘 要：优化并全合成里氏木霉几丁质酶基因，在毕赤酵母中实现分泌表达。产物几丁质酶的蛋白浓度达0.17 mg/mL，最适 pH 为 5.6，最适温度为 65 ℃，酶活为 0.52 U/mL。该酶在 50 ℃及以下较稳定。利用该酶水解低脱乙酰度壳聚糖并对产物的组成及结构进行分析。超高效液相色谱-四极杆飞行时间质谱（Ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry，UPLC-QTOF MS）检测及分析结果显示，酶解产物中包含至少 41 种聚合度 2-18，不同脱乙酰度的壳寡糖组分；核磁共振（Nuclear magnetic resonance，NMR）检测及分析结果显示，产物壳寡糖的还原端主要为 *N*-乙酰氨基葡萄糖，非还原端则同时含有 *N*-乙酰氨基葡萄糖及氨基葡萄糖。相关结果可为壳寡糖的结构与功能关系研究提供参考。
关键词：里氏木霉；几丁质酶；毕赤酵母；壳寡糖；UPLC-QTOF MS；NMR

Expression of Chitinase from *Trichoderma reesei* and Analysis the Composition and Structure of its Hydrolysates

JIAO Si-ming, CHENG Gong, ZHANG Yu-chen, FENG Cui, REN Li-shi, LI Jian-jun, DU Yu-guang*
(State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China)

Abstract: Chitinase encoding gene of *Trichoderma reesei* was optimized, synthesized and secretorily expressed in *Pichia pastoris*. The protein concentration of the expressed chitinase reached 0.17 mg/ml. The optimum pH and temperature of the chitinase was 5.6 and 65 ℃, respectively, and enzymatic activity reached 0.52 U/ml. The chitinase was continuously thermostable at 50 ℃. The low deacetylated chitosan was hydrolyzed by this enzyme and the composition and structure of these hydrolysates were analyzed. Ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF MS) results showed that these hydrolysates contained at least 41 different kinds of chitooligosaccharides with degree of polymerization of 2-18 and different degree of deacetylation. Nuclear magnetic resonance (NMR) results indicated that, the reducing end of these oligosaccharide fractions were mainly composed of *N*-Acetylglucosamine while both glucosamine and *N*-Acetylglucosamine were found in the non-reducing end. These results would provide a reference for study of the relationship between the structure and function of chitooligosaccharides.
Key words: *Trichoderma reesei*; chitinase; *Pichia pastoris*; chitooligosaccharides; Ultra-performance liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC-QTOF MS); Nuclear magnetic resonance (NMR)
中图分类号：TS245.9 文献标志码：A 文章编号：

壳寡糖是由氨基葡萄糖（Glucosamine，GlcN，D）、*N*-乙酰氨基葡萄糖（*N*-Acetylglucosamine，GlcNAc，A）或者二者的组合通过β-1,4 糖苷键连接而成的寡聚物，通常聚合度（degree of polymerization，DP）<20[1]。壳寡糖通常由甲壳素或者其脱乙酰产物壳聚糖通过物理、化学或者生物

* 国家重点研发计划项目（2017YFD0200902）、国家自然科学基金联合基金项目（U1608255）、中科院重点部署项目（KFZD-SW-218）资助.
** 通讯作者，电子邮箱：ygdu@ipe.ac.cn

chinaXiv:201808.00116v1

等方法降解获得，已被证实具有抗炎、抗肿瘤及激活植物免疫等多种生物活性[2-6]。机制研究提示，壳寡糖通过与动植物的特定受体作用发挥活性。目前，已有多种可特异性识别壳寡糖的受体被发现，如动物的甘露糖受体[7]、几丁质酶样结合蛋白 YKL-39[8, 9]及植物的几丁质受体[10-12]等。这些受体的共同特征是都通过识别壳寡糖中的 A 糖与其结合，提示该单糖在其生物活性发挥过程中的核心作用。

传统的壳寡糖规模制备过程中，常采用较高脱乙酰度（Degree of deacetylation, DDA），如 DDA>85%的壳聚糖作为底物，利用具有壳聚糖水解活性的非特异性商品酶，如纤维素酶[13]、蛋白酶[14]及脂肪酶[15]等对其水解，最终获得壳寡糖。使用上述方法制备的壳寡糖中残留的 A 糖已经较少，可能影响其与特定受体的有效结合，从而影响其活性的充分发挥。同时，非特异性商品酶类中可能同时含有多种壳聚糖水解酶类，使得水解产物的结构不可控，难以用于壳寡糖的构效关系研究，阻碍了新型高活性壳寡糖产品的研发。因此，有必要对现有的壳寡糖规模制备工艺进行改进，以获得结构可控，更高生物活性的壳寡糖。

为最大程度保留壳寡糖中的关键 A 糖活性单元，有必要使用低脱乙酰度的壳聚糖作为底物。此时，由于底物中同时含有 D 糖及 A 糖，壳聚糖酶及几丁质酶均可对其有效水解。利用这些酶类对底物水解位点识别的差异，可以制备获得 DP、DDA 甚至乙酰化位点分布等结构特征可控的壳寡糖。目前，针对壳寡糖制备的研究主要集中在壳聚糖酶的表达、鉴定并进一步水解高脱乙酰度壳聚糖获得组分较少的壳寡糖。本研究选择已经在工业及食品酶制剂规模制备中较广泛应用的毕赤酵母表达系统对来源于里氏木霉的几丁质酶进行分泌表达，使用该酶水解低脱乙酰度壳聚糖制备新结构壳寡糖并对其组成及结构特征进行鉴定。

1　材料与方法

1.1　材料与试剂

质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、T4 连接酶、DNA Marker 及 *E. coli* DH5α化学感受态细胞购自宝日医（北京）生物技术有限公司。毕赤酵母表达载体 pPIC9 购自优宝生物；pGBG1 为 pPIC9 信号肽核酸序列根据毕赤酵母密码子的偏好性优化后的载体。毕赤酵母 GS115、*Xho* Ⅰ、*Not* Ⅰ、*Bgl* Ⅱ及色谱纯乙腈均购自美国 Thermo Fisher 公司。毕赤酵母培养基 MD、BMGY 及 BMMY 的配制方法及毕赤酵母电转化感受态细胞制备方法均参考毕赤酵母表达手册（美国 Thermo Fisher 公司）。甲壳素购自 Sigma-Aldrich 公司。蛋白 Marker 购自北京索莱宝科技有限公司。其他试剂均为分析纯。

1.2　仪器与设备

L535R 型低温冷冻离心机，湘仪离心机仪器有限公司。RE-2000B 型旋转蒸发器，巩义市英峪高科仪器厂。LGJ-10FD 型真空冷冻干燥机，北京松源华兴科技发展有限公司。DYY-6C 型核酸及蛋白电泳系统，北京六一生物科技有限公司。Tanon-1600 型凝胶成像系统，上海天能科技有限公司。MicroPulserTM 电转仪，美国 BIO-RAD 公司。ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱（100 mm×2.1 mm，1.7 μm），Waters XEVO G2-S QTOF 质谱仪，配有 Lock-spray 接口；电喷雾离子源(ESI)及 Masslynx 4.1 质谱工作站软件，美国 Waters 公司。AVANCE III 600MHz 核磁共振仪，Bruker 公司。

1.3　方法

1.3.1　里氏木霉几丁质酶基因序列优化、全合成及表达载体构建

使用毕赤酵母偏好的密码子，对里氏木霉 QM6a[16]的潜在几丁质酶（GenBank: XP_006968137.1，23-424）基因进行优化并在末端添加 *Xho* Ⅰ及 *Not* Ⅰ酶切位点。委托北京擎科新业生物技术有限公司进行全合成。利用 *Xho* Ⅰ及 *Not* Ⅰ回收 pUC18 上的目的基因，连接至相同内切酶水解的载体 pGBG1 中，转化至 *E. coli* DH5α。使用酶切及测序方法对构建的表达载体的正确性进行验证。

1.3.2　里氏木霉几丁质酶毕赤酵母表达及鉴定

使用 *Bgl* Ⅱ对重组质粒进行线性化并将含目的基因的片段电转至毕赤酵母 GS115 中。使用 MD 平板筛选获得重组子并转接至含有胶体几丁质（0.5%）的 BMMY 平板上，筛选出水解圈最大的菌株。

chinaXiv:201808.00116v1

ChinaXiv合作期刊

BMGY 培养基对筛选的菌株培养并使用甲醇进行诱导表达共计 120h。使用 SDS-PAGE 检测诱导表达上清中的蛋白表达情况，Bradford 法测定上清的蛋白浓度。以前期制备的 DDA 为 62%壳聚糖[17]为底物，使用 DNS 方法测定壳聚糖的酶活。为确定最适反应条件，在 pH 3.6-8.0 范围内（pH 3.6-5.6 时使用 50 mmol/l 的乙酸钠缓冲液，pH 6.0-8.0 时使用 50 mmol/l 磷酸缓冲液）测定该酶的最适 pH 值，30 ℃ -90 ℃范围内确定最佳反应温度。在 40 ℃，50 ℃及 60 ℃下处理壳聚糖酶 1 h，每隔 20 min 测一次残留的酶活，以确定该酶的热稳定性。

1.3.3　低脱乙酰壳寡糖制备及组分分析

使用表达的几丁质酶水解 DDA 为 62%的壳聚糖制备壳寡糖，具体方法如下：称取 50 g 壳聚糖，加至 1000 ml 水中，加入乙酸溶解并调节至 pH 6.0。再加入 100 ml 酶液，40 ℃下搅拌反应 48 h。离心去除不溶物，使用旋转蒸发仪将上清浓缩至约 300 ml 后冻干。称取 10 mg 壳寡糖冻干样品，使用超纯水配制成 1 mg/ml 溶液。UPLC 检测条件为：使用 Waters ACQUITY UPLC BEH Amide 色谱柱，流动相为 0. 1%甲酸水(A)-乙腈(B)，梯度洗脱(0～2 min：15% A，2～32 min：15%～50% A，32～33 min：50%～80% A，33～36 min：80% A，36～37 min：80%～15% A，37～44min：15% A)，柱温为 35 ℃，流速为 0. 3 ml/min，进样量为 1 μL。质谱检测条件为：ESI 源，正离子扫描模式，毛细管电压为 3 kV，锥孔电压为 60 V，离子源温度为 150 ℃，脱溶剂气温度为 500 ℃，锥孔气流量为 50 l /h，脱溶剂气流量为 800 l/h，碰撞能量为 30～60 V，离子能量为 3 V，每 0.25 s 采集 1 次图谱；质量扫描范围为 150～2000 m/z。使用 Masslynx 4.1 质谱工作站软件对获取的液质结果进行分析，以获得潜在的壳寡糖质谱信息并对壳寡糖的组成进行推测。

1.3.4　低脱乙酰壳寡糖结构分析

使用液体 ^{1}H NMR 及 ^{13}C NMR 分别对制备的壳寡糖的还原端及非还原端单糖组成进行分析，具体方法为：称取 25 mg 制备的壳寡糖冻干样品，加入 0.50 ml D_2O，待其充分溶解后加样检测。以 3-(三甲基甲硅烷基)丙酸-d4 钠盐为内标，使用 AVANCE III 600MHz 核磁共振仪对样品进行检测，其中，^{1}H NMR 检测时对水峰进行抑制以减少其干扰。获得的原始数据使用分析软件 MestReNova 打开后，使用内标校正位移值后，参考 Sasaki 等[18]的方法对特定部位单糖进行标记，具体的参考位移值包括 ^{1}H NMR 中的还原端 D 糖（5.19 ppm）、还原端 A 糖（5.43 ppm）以及 ^{13}C NMR 中 5 位碳（C5）的非还原端 D（79.0 ppm）及非还原端 A 糖（78.5 ppm）等。

2　结果与讨论

2.1　几丁质酶基因毕赤酵母表达及鉴定

里氏木霉 QM6a 几丁质酶（GenBank: XP_006968137.1）的编码基因长度为 1 272 bp，编码蛋白包含 424 个氨基酸，在蛋白的氨基末端包含一个 22 氨基酸组成的信号肽序列。将密码子优化后的基因命名为 *trchi18*（GenBank: MG595778）。使用酶切方法对构建好的表达载体进行验证，电泳结果显示，经 *Xho* I 及 *Not* I 双酶切后，在 1 000-1 500 bp 之间出现了一个条带（E1），与目的基因（1 242 bp）大小相符；使用 *Bgl* II 对质粒线性化后出现了预期的两个片段（E2），其中，10 kb 附近为含有目的基因的片段，3 kb 附近为含有抗性基因的片段（图 1a）。双末端测序结果也确认目的基因被正确构建至表达载体中。使用 SDS-PAGE 方法确定目标蛋白（记为 Trchi18）的表达情况，结果显示，在 48 kD 附近间出现了一个较明显的蛋白条带（P1），稍大于该蛋白的预测值（44.7 kD）（图 1b）。Bradford 法测定发酵上清中的粗蛋白质浓度为 0.17 mg/mL。使用 DNS 法对表达的几丁质粗酶性质进行了鉴定。结果显示，该酶的最适 pH 为 5.6，最适反应温度为 65 ℃，在上述最适反应条件下的比酶活为 0.52 U/mL。该酶在 50 ℃及以下时较稳定，处理 1 h 后酶活没有明显较低，当温度升高至 60 ℃时，该酶

chinaXiv:201808.00116v1

chinaXiv:201808.00116v1

很快失活。

里氏木霉已被用于纤维素酶、木聚糖酶、β-葡聚糖酶及酯酶等工业用酶制剂的发酵制备。我们在前期研究中发现，里氏木霉来源的商品纤维素酶具有一定的壳聚糖水解活性，通过对其水解产物的结构鉴定发现，起水解作用的可能主要为几丁质酶[17]。Seidl 等[19]通过检索发现，里氏木霉基因组中存在至少 18 个潜在的几丁质酶基因，说明几丁质酶在里氏木霉中大量存在。本研究对来源于里氏木霉 QM6a 中的一个潜在几丁质酶基因进行表达，用于壳寡糖的制备。在另一项研究中，Ike 等[20]已对来源于里氏木霉 PC-3-7 中与本研究同源性最高的几丁质酶进行了克隆、原核表达及鉴定，结果显示，该几丁质酶在原始菌株中分离时为约 46 kD，而预测的蛋白质大小约 42 kD，提示可能发生了糖基化修饰。本研究获得的几丁质酶 Trchi18 也稍大于预测值，推测其在表达过程中也发生了糖基化。

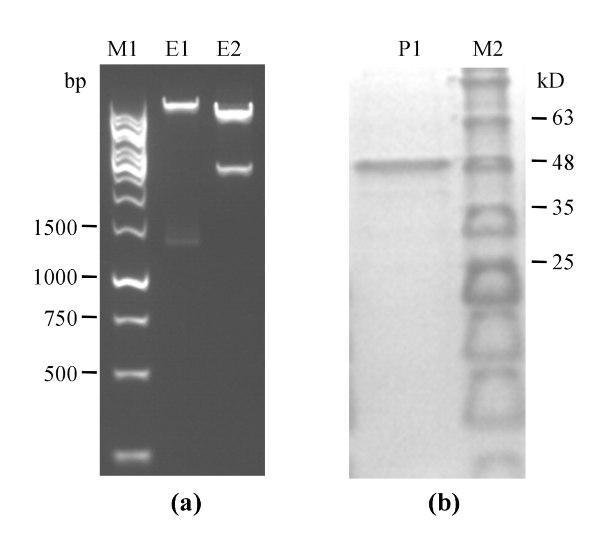


图 1　几丁质酶基因 *trchi18* 重组质粒酶切产物(a)及其蛋白表达产物(b)电泳图谱

Fig. 1　Electrophoresis map of chitinase gene *trchi18* recombinant plasmid restriction enzyme hydrolysates (a) and protein expression products (b)

(a) M1: DNA Marker; E1: plasmid *trchi18*-pGBG1 digested with XhoⅠand NotⅠ; E2: plasmid *trchi18*-pGBG1 digested with BglⅡ; (b) P1: Expressed protein Trchi18; M2: Protein marker.

2.2　几丁质酶 Trchi18 水解产物组成分析

使用 UPLC-QTOF MS 对几丁质酶 Trchi18 水解低脱乙酰度壳聚糖的产物进行检测及分析。离子流图结果显示，水解产物已被一定程度分离（图 2a）。选取其中的 16 个典型峰（A-P），利用对应的质谱信息，在这些峰中共计找到 41 个较明显的壳寡糖组分（图 2b）。根据一级质谱信息，对这些不同质荷比（m/z）壳寡糖组分的组成进行分析，推测它们为聚合度 2-18，不同脱乙酰度的壳寡糖（表 1）。将液相的总离子流图谱与质谱信息对照时发现，壳寡糖根据其中含有的 D 糖的数量由少至多出峰，使用的色谱柱基本能将不同 D 糖数量的壳寡糖组分分离。当相同 D 糖数量下出现不同数量的 A 糖时，当 D 糖数量为 3 及以下时，可以将不同 A 糖含量壳寡糖组分分离；当 D 糖含量为 4 糖及以上时，不同 A 糖含量的组分难以分开。

传统壳寡糖制备过程中选用的底物通常为 DDA>85%的壳聚糖，只有壳聚糖酶，或者含有壳聚糖酶水解活性的非特异性酶才能对其充分水解。当 DDA 降低时，壳聚糖中的 A 糖更多保留，此时，几丁质酶或者含有几丁质酶活性的非特异性酶也可以对其水解，用于壳寡糖的制备。Sorbotten 等[21]利用来源于粘质沙雷菌（*Serratia marcescens*）的几丁质酶水解不同 DDA 的壳聚糖，结果显示，产物 DP 的分布随着 DDA 的改变而发生变化。上述结果提示，通过 DDA 的控制，可以实现产物 DP 的调控。本研究采用几丁质酶水解低 DDA 壳聚糖，与传统壳聚糖主要获得 DP<10 的壳寡糖相比，产物的 DP 分布更加广泛（2-20），可能具有更高的生物活性。

chinaXiv:201808.00116v1

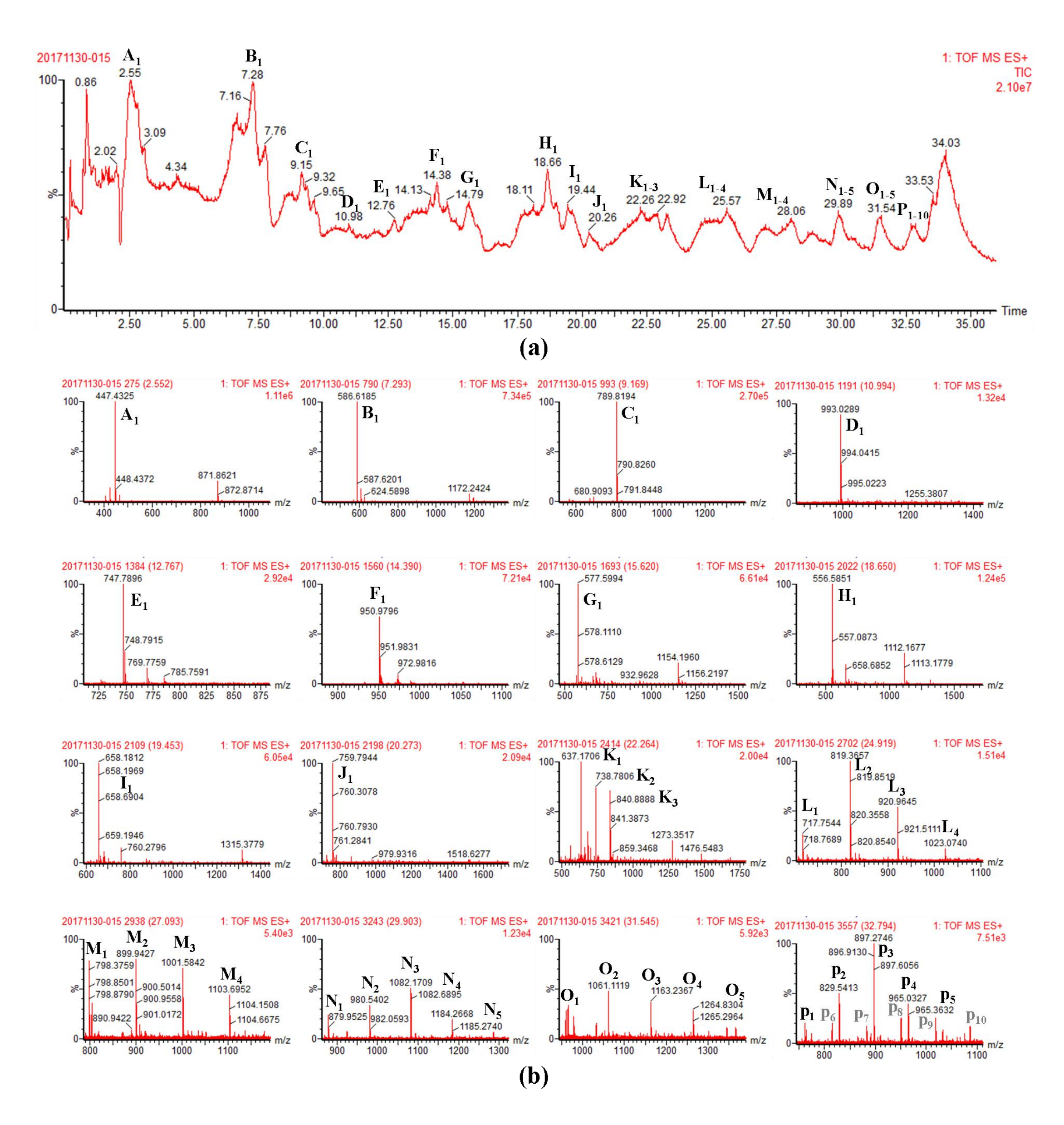


图 2 Trchi18 酶解产物总离子流图(a)及质谱图(b)

Figure 3 TIC and mass spectrogram of Trchi18 hydrolysis products

表 1 Trchi18 酶解产物组分鉴定

Table 1 Components identification of Trchi18 hydrolysis products

Numbers	Retention time (min)	Determined m/z	Theoretical m/z	Predicted components
A_1	2.55	447.7	447.2	$[A2+Na]^+$
B_1	7.29	586.6	586.2	$[D1A2+H]^+$
C_1	9.17	789.8	789.3	$[D1A3+H]^+$
D_1	10.99	993.0	992.4	$[D1A4+H]^+$
E_1	12.77	747.8	747.3	$[D2A2+H]^+$
F_1	14.39	951.0	950.4	$[D2A3+H]^+$
G_1	15.62	577.6	577.2	$[D2A4+2H]^{2+}$
H_1	18.65	556.6	556.2	$[D3A3+2H]^{2+}$

I_1	19.45	658.2	657.8	$[D3A4+2H]^{2+}$
J_1	20.27	759.8	759.3	$[D3A5+2H]^{2+}$
K_1	22.26	637.2	636.8	$[D4A3+2H]^{2+}$
K_2	22.26	738.8	738.3	$[D4A4+2H]^{2+}$
K_3	22.26	840.4	839.8	$[D4A5+2H]^{2+}$
L_1	24.92	717.8	717.3	$[D5A3+2H]^{2+}$
L_2	24.92	819.4	818.8	$[D5A4+2H]^{2+}$
L_3	24.92	921.0	920.4	$[D5A5+2H]^{2+}$
L_4	24.92	1 022.6	1 021.9	$[D5A6+2H]^{2+}$
M_1	27.09	798.3	797.8	$[D6A3+2H]^{2+}$
M_2	27.09	900.0	899.4	$[D6A4+2H]^{2+}$
M_3	27.09	1 001.6	1 000.9	$[D6A5+2H]^{2+}$
M_4	27.09	1 103.2	1 102.4	$[D6A6+2H]^{2+}$
N_1	29.90	878.9	878.4	$[D7A3+2H]^{2+}$
N_2	29.90	980.5	979.9	$[D7A4+2H]^{2+}$
N_3	29.90	1 082.2	1 081.4	$[D7A5+2H]^{2+}$
N_4	29.90	1 183.8	1 183.0	$[D7A6+2H]^{2+}$
N_5	29.90	1 285.3	1 284.5	$[D7A7+2H]^{2+}$
O_1	31.55	959.5	958.9	$[D8A3+2H]^{2+}$
O_2	31.55	1 061.1	1 060.4	$[D8A4+2H]^{2+}$
O_3	31.55	1 162.7	1 162.0	$[D8A5+2H]^{2+}$
O_4	31.55	1 264.4	1 263.5	$[D8A6+2H]^{2+}$
O_5	31.55	1 366.0	1 365.1	$[D8A7+2H]^{2+}$
P_1	32.79	761.5	761.0	$[D9A4+3H]^{3+}$
P_2	32.79	829.2	828.7	$[D9A5+3H]^{3+}$
P_3	32.79	896.9	896.4	$[D9A6+3H]^{3+}$
P_4	32.79	964.7	964.1	$[D9A7+3H]^{3+}$
P_5	32.79	1 032.4	1 031.8	$[D9A8+3H]^{3+}$
P_6	32.79	814.8	814.7	$[D10A4+3H]^{3+}$
P_7	32.79	882.9	882.4	$[D10A5+3H]^{3+}$
P_8	32.79	950.7	950.1	$[D10A6+3H]^{3+}$
P_9	32.79	1 018.4	1 017.7	$[D10A7+3H]^{3+}$
P_{10}	32.79	1 086.1	1 085.4	$[D10A8+3H]^{3+}$

Notes: A represents *N*-Acetyl glucosamine, D represents glucosamine, the subsequent numbers represent the number of monosaccharide in these predicted components.

2.3 几丁质酶 Trchi18 水解产物结构分析

为获得Trchi18对壳聚糖底物的位点识别特性及产物的结构特征，进一步使用 ^{1}H NMR 及 ^{13}C NMR

chinaXiv:201808.00116v1

chinaXiv:201808.00116v1

对水解产物壳寡糖的末端结构特征进行了分析。结果显示，水解产物的还原末端主要由 A 糖构成（图 3a），而非还原末端则同时含有 D 糖及 A 糖（图 3b）。上述结果说明该酶可同时水解 A-A 及 A-D 糖苷键。Seidl 等[19]在前期对里氏木霉菌株 QM6a 中的 18 个潜在几丁质酶的序列进行分析时发现，所有几丁质酶均属于糖苷水解酶 18 家族。该家族几丁质酶的一个典型特征便是在水解位点的-1 位必须为 A 单元，因此，水解产物的还原端理论上均应该为 A 糖。本研究的 NMR 结果也进一步证实了表达的几丁质酶属于 18 家族糖苷水解酶。

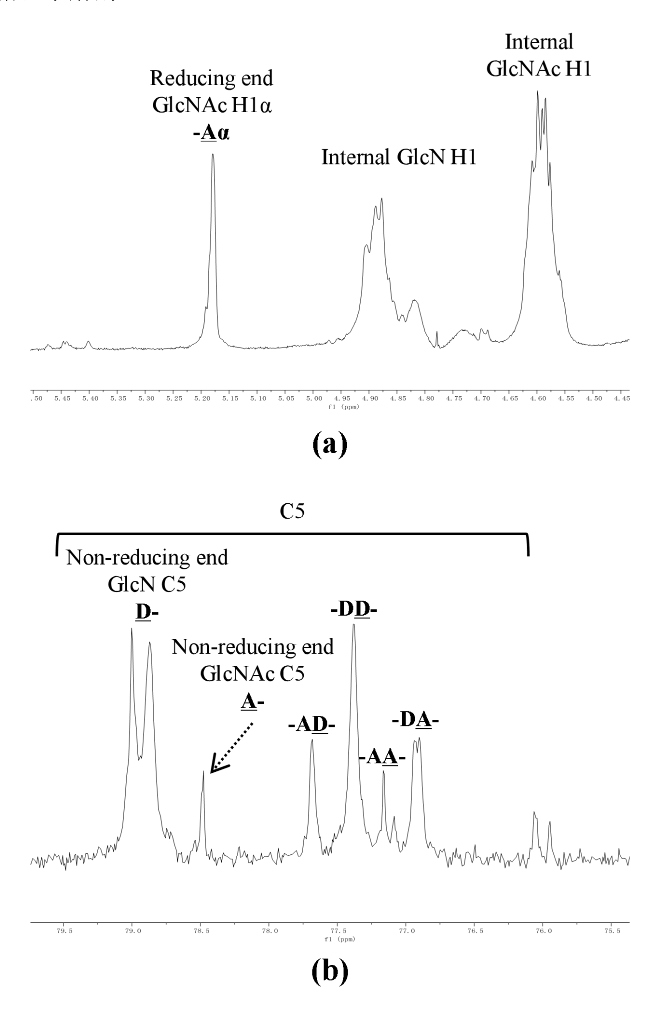


图 3　Trchi18 酶解产物 ^{1}H NMR (a)及 ^{13}C NMR (b)分析

Figure 3　1H NMR and ^{13}C NMR spectra of Trchi18 hydrolysis products

3　结 论

综上，本研究在毕赤酵母中分泌表达来源于里氏木霉的几丁质酶基因，使用表达的几丁质酶对低脱乙酰度壳聚糖进行水解并对产物中的壳寡糖组成及结构特征进行分析。与传统方法制备的壳寡糖相比，以里氏木霉几丁质酶水解低脱乙酰度壳聚糖制备的壳寡糖组分多样，末端结构可控，可能具有更高的生物活性，具有更广阔的应用前景。

参考文献：

[1]　Lodhi G, Kim Y S, Hwang J W, et al. Chitooligosaccharide and its derivatives: preparation and biological applications. Biomed Research International, 2014, 2014(1): 654913.

[2]　Zou P, Yang X, Wang J, et al. Advances in characterization and biological activities of chitosan and chitosan oligosaccharides. Food Chemistry, 2016, 190: 1174-1181.

[3]　Azuma K, Osaki T, Minami S, et al. Anticancer and anti-inflammatory properties of chitin and chitosan oligosaccharides. Journal

ChinaXiv合作期刊

of functional biomaterials, 2015, 6(1): 33-49.

[4] Shinya T, Nakagawa T, Kaku H, et al. Chitin-mediated plant-fungal interactions: catching, hiding and handshaking. Current Opinion in Plant Biology, 2015, 26: 64-71.

[5] Je J Y, Kim S K. Chitooligosaccharides as potential nutraceuticals: production and bioactivities. Advances in Food and Nutrition Research, 2012, 65: 321-336.

[6] Jung W J, Park R D. Bioproduction of chitooligosaccharides: present and perspectives. Marine Drugs, 2014, 12(11): 5328-5356.

[7] Han Y, Zhao L, Yu Z, et al. Role of mannose receptor in oligochitosan-mediated stimulation of macrophage function. International Immunopharmacology, 2005, 5(10): 1533-1542.

[8] Schimpl M, Rush C L, Betou M, et al. Human YKL-39 is a pseudo-chitinase with retained chitooligosaccharide-binding properties[J]. Biochemical Journal, 2012, 446(1): 149-157.

[9] Ranok A, Wongsantichon J, Robinson R C, et al. Structural and thermodynamic insights into chitooligosaccharide binding to human cartilage chitinase 3-like protein 2 (CHI3L2 or YKL-39). Journal of Biological Chemistry, 2015, 290(5): 2617-2629.

[10] Hayafune M, Berisio R, Marchetti R, et al. Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2014, 111(3): E404-E413.

[11] Liu B, Li J F, Ao Y, et al. Lysin motif-containing proteins LYP4 and LYP6 play dual roles in peptidoglycan and chitin perception in rice innate immunity. Plant Cell, 2012, 24(8): 3406-3419.

[12] Xu J, Wang G, Wang J, et al. The lysin motif-containing proteins, Lyp1, Lyk7 and LysMe3, play important roles in chitin perception and defense against *Verticillium dahliae* in cotton. BMC Plant Biology, 2017, 17(1): 148.

[13] Tegl G, Ohlknecht C, Vielnascher R, et al. Cellobiohydrolases produce different oligosaccharides from chitosan. Biomacromolecules, 2016, 17(6): 2284-2292.

[14] Roncal T, Oviedo A, Lopez de Armentia I, et al. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. Carbohydrate Research, 2007, 342(18): 2750-2756.

[15] Lee D X, Xia W S, Zhang J L. Enzymatic preparation of chitooligosaccharides by commercial lipase. Food Chemistry, 2008, 111(2): 291-295.

[16] Martinez D, Berka R M, Henrissat B, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). Nature Biotechnology, 2008, 26(5): 553-560.

[17] 程功, 任立世, 焦思明, 等. 纤维素酶制备低脱乙酰度壳寡糖及其组成分析. 食品科技, 2018, 43(04): 189-193.
Cheng G, Ren L, Jiao S, et al. Composition analysis and production of chitooligosanccharides with low degree of deacetylation by cellulase. Food Sience and Technology, 2018, 43(4): 189-193.

[18] Sasaki C, Varum K M, Itoh Y, et al. Rice chitinases: sugar recognition specificities of the individual subsites. Glycobiology, 2006, 16(12): 1242-1250.

[19] Seidl V, Huemer B, Seiboth B, et al. A complete survey of Trichoderma chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases. FEBS Journal, 2005, 272(22): 5923-5939.

[20] Ike M, Nagamatsu K, Shioya A, et al. Purification, characterization, and gene cloning of 46 kDa chitinase (Chi46) from *Trichoderma reesei* PC-3-7 and its ex-pression in *Escherichia coli*. Applied Microbiology Biotechnology, 2006, 71(3): 294-303.

[21] Sorbotten A, Horn S J, Eijsink V G, et al. Degradation of chitosans with chitinase B from *Serratia marcescens*. Production of chito-oligosaccharides and insight into enzyme processivity. FEBS Journal, 2005, 272(2): 538-549.

chinaXiv:201808.00116v1